



DÁRIO FILIPE
VIEIRA ROSA

**ESTUDOS DE PROCESSOS MEOR –
TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO
AVANÇADA DO PETRÓLEO COM
MICRORGANISMOS**

Relatório de Dissertação do Mestrado em
Engenharia Biológica e Química

ORIENTADORA

Professora Doutora Fátima Serralha

COORIENTADORA

Professora Doutora Raquel Duarte

Dezembro 2019

DÁRIO FILIPE
VIEIRA ROSA

**ESTUDOS DE PROCESSOS MEOR –
TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO
AVANÇADA DO PETRÓLEO COM
MICRORGANISMOS**

JÚRI

Presidente: Professora Doutora Maria de Lurdes de
Figueiredo Gameiro (ESTBarreiro/IPS)

Orientadora: Professora Doutora Maria de Fátima
Nunes Serralha (ESTBarreiro/IPS)

Vogal: Professor Doutor Luís Joaquim Pina da Fonseca
(Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa)

Dezembro 2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a toda a comunidade da ESTBarreiro por me ter recebido e acompanhado durante a jornada escolar, em especial destaque às professoras Maria de Fátima Serralha e Raque Duarte pela paciência, motivação e disponibilidade prestados durante a realização do estágio.

Aos responsáveis dos laboratórios de Química e Civil, a Anabela Borralho e o Alexandre Gamito, por partilharem o seu conhecimento e auxílio prestado na execução de novas competências laboratoriais.

À Professora Sónia Santos pela cedência dos microrganismos usados neste trabalho e ao Professor Marco Marques pela cedência do petróleo. À Professora Marta Justino por toda a ajuda ao longo da realização da parte prática. À Professora Ana Paula Serro, do Instituto Superior Técnico, por me ter recebido nas instalações laboratoriais do IST e partilha do seu conhecimento.

Ao meu grande amigo João Santos, pela sua bondade, honestidade e de ter sempre acreditado em mim, mesmo durante períodos menos positivos.

Aos meus pais, irmãos e toda a família por me terem acompanhado durante toda a vida e de nunca terem desistido de mim.

Um grande obrigado a todos.

RESUMO

Neste trabalho pretendeu-se implementar técnicas que permitam a Recuperação Avançada do Petróleo Melhorada por Microrganismos (MEOR). Assim, estudou-se a capacidade das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* sintetizarem biosurfactantes, realizando-se também, um ensaio para isolar colónias de bactérias presentes em areias contaminadas com petróleo.

O crescimento das bactérias deu-se inicialmente em meio de Luria-Bertani, fase de pré-cultura, e posteriormente em meios enriquecidos em nutrientes. O crescimento bacteriano foi monitorizado através das medições de densidade ótica.

Para a avaliação da produção de biosurfactante, foram realizados testes qualitativos, nomeadamente o ensaio de propagação do petróleo e a análise de emulsão, bem como a determinação da tensão superficial dos extratos com biosurfactante. Com o objetivo de avaliar a recuperação do petróleo num reservatório, foi contruído um modelo de coluna com areia empacotada de forma a realizarem-se simulações das operações de recuperação de petróleo na presença de biosurfactantes.

A reduzida quantidade de biosurfactante produzida, indiciada pelos resultados negativos dos testes qualitativos, foi confirmada pela medição da tensão superficial do sobrenadante. De facto, a tensão superficial ao longo da fermentação não sofreu reduções significativas, como seria previsto se houvesse produção de biosurfactante. Adicionalmente, na simulação da recuperação de petróleo na coluna com areia não foi verificada qualquer melhoria pela presença dos biosurfactantes. Estes resultados permitem confirmar que as bactérias sem contacto prévio e duradouro com o petróleo não se encontram adaptadas para a produção do biosurfactantes.

Nos testes de corrosão, a massa da amostra não sofreu alterações significativas mesmo após 45 dias, não significando necessariamente a falta de oxidação, mas provavelmente que a massa da amostra não foi adequada neste estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Petróleo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, biosurfactante, MEOR.

ABSTRACT

This work aimed to implement techniques that allow Microbial Enhanced Enhanced Oil Recovery (MEOR). Thus, the ability of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* to synthesize biosurfactants was studied, as well as an assay to isolate colonies of bacteria present in oil contaminated sands.

Bacterial growth was initially in Luria-Bertani broth, preculture phase, and later in nutrient-enriched broth. Bacterial growth was monitored by optical density measurements.

For the evaluation of biosurfactant production, qualitative tests were performed, namely the oil propagation test and emulsion analysis, as well as the determination of the surface tension. In order to evaluate oil recovery in a reservoir, a packed sand column model was constructed to simulate oil recovery operations in the presence of biosurfactants.

The reduced amount of biosurfactant produced, indicated by the negative results of the qualitative tests, was confirmed by measuring the supernatant surface tension. In fact, the surface tension throughout the fermentation did not decrease significantly, as would be expected if biosurfactant was produced. Additionally, in the simulation of oil recovery in the sand column no improvement was verified by the presence of the biosurfactant. These results confirm that bacteria without previous and lasting contact with oil are not adapted for the production of biosurfactants.

In corrosion test, sample mass did not suffer meaningful changes even after 45 days, does not meaning necessarily the lack of oxidation but most likely sample mass was not suitable in this study.

KEYWORDS: oil, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, biosurfactant, MEOR.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
SIGLAS E ABREVIATURAS	xv

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 2

2.1. PETRÓLEO E INTERESSE ECONÓMICO 2

2.2. FASES DE EXTRAÇÃO DO PETRÓLEO 2

2.3. TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO TERCIÁRIAS 3

2.4. BIOSURFACTANTES 6

2.4.1. CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES 6

2.4.1.1. Glicolípidos 6

2.4.1.2. Lipopéptidos..... 7

2.4.1.3. Ácidos gordos 8

2.4.1.4. Surfactantes poliméricos..... 8

2.4.1.5. Surfactantes particulados..... 8

2.4.2. APLICAÇÕES	9
2.5. CORROSÃO	10
2.5.1. CORROSÃO POR PICADAS	10
2.5.2. CORROSÃO POR EROSÃO	11
2.5.3. CORROSÃO GALVÂNICA	12
2.5.4. BIOCORROSÃO.....	12

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS E REAGENTES	14
3.2. EQUIPAMENTOS	16
3.1. MÉTODOS	17
3.3.1. CRESCIMENTO BACTERIANO	17
3.3.2. TESTE DA GLUCOSE	18
3.3.3. ENSAIO DE PROPAGAÇÃO DO PETRÓLEO.....	19
3.3.4. ANÁLISE DA EMULSIFICAÇÃO	19
3.3.5. MEDIÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL.....	19
3.3.6. CONSTRUÇÃO DE UM MODELO DE COLUNA COM AREIA EMPACOTADA.....	20
3.3.7. SIMULAÇÃO DE EXTRAÇÃO DO PETRÓLEO	21
3.3.8. TESTE DA CORROSÃO.....	21
3.3.9. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS.....	21

4. RESULTADOS E ANÁLISE DE RESULTADOS

4.1. CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS	22
4.1.1. CURVAS DE CRESCIMENTO.....	22
4.1.2. QUANTIFICAÇÃO DA GLUCOSE AO LONGO DO CRESCIMENTO	25

4.2. CARACTERIZAÇÃO DO BIOSURFACTANTE	25
4.2.1. ENSAIO DE PROPAGAÇÃO DO PETRÓLEO.....	25
4.2.2. ANÁLISE DE EMULSIFICAÇÃO	26
4.2.3. RESULTADOS DA TENSÃO SUPERFICIAL OBTIDOS.....	27
4.3. CONSTRUÇÃO DO MODELO DE COLUNA PARA SIMULAÇÃO DO POÇO	29
4.4. TESTE DA VELOCIDADE DE CORROSÃO.....	30
4.5. CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DE AREIA CONTAMINADA.....	31
 5. CONCLUSÕES	 33
 6. BIBLIOGRAFIA.....	 34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Forças de tensão superficial e interfacial exercidas numa interface água/óleo [26].	6
Figura 2.2. Estrutura química de diferentes biosurfactantes. A) ramnolípido; B) trealolípido; C) soforolípido; D) surfactina; E) surfactante particulado [45].	9
Figura 2.3. Representação da aparência de picadas na corrosão [49].	11
Figura 2.4. A ação das Bactérias Redutoras de Sulfato no aço [47].	13
Figura 3.1. Teste de propagação do petróleo. A presença de uma zona circular incolor confirma a presença de biosurfactante [56].	19
Figura 3.2. Vista geral de todos os componentes que constituem o goniómetro [57].	20
Figura 3.3. Coluna preenchida com areia para simulação de um poço petrolífero.	20
Figura 4.1. Leitura da densidade ótica durante o crescimento III da pré-cultura de <i>Bacillus cereus</i> .	23
Figura 4.2. Leitura da densidade ótica durante o crescimento III da cultura de <i>Bacillus cereus</i> .	23
Figura 4.3. Leitura da densidade ótica durante o crescimento II da pré-cultura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	24
Figura 4.4. Leitura da densidade ótica durante o crescimento II da cultura de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	24
Figura 4.5. Análise espectralométrica da glucose durante o crescimento V de <i>Bacillus cereus</i> .	25
Figura 4.6. Imagem do ensaio de propagação do petróleo na presença da solução de biosurfactante produzido pelas bactérias <i>B. cereus</i> do crescimento IV.	26
Figura 4.7. Imagem do resultado da análise de emulsificação, com apenas duas zonas distintas.	27
Figura 4.8. Evolução da tensão superficial do sobrenadante durante o crescimento VI de <i>Bacillus cereus</i> . A tensão superficial da água está representada a tracejado.	28

Figura 4.9. Tensão superficial do sobrenadantes em fermentações de <i>B. cereus</i> , <i>B.subtilis</i> e <i>P. aeruginosa</i> [6].	28
Figura 4.10. Coluna com petróleo retido.	29
Figura 4.11. Amostras de placas de aço 316 mergulhadas em I) crude, II) Solução salina 10 g/L; III) Solução de biosurfactante numa fase inicial.	30
Figura 4.12. Amostras de placas de aço 316 mergulhadas em I) crude, II) Solução salina 10 g/L; III) Sobrenadante da biosurfactante passados 7 dias.	30
Figura 4.13. Amostras de placas de aço 316 mergulhadas em I) crude, II) Solução salina 10 g/L; III) Solução de biosurfactante passados 45 dias.	30
Figura 4.14. Variação da massa das placas de aço 316 mergulhadas em I) crude, II) Solução salina 10 g/L; III) Solução de biosurfactante, no início ao fim de 7 e 45 dias.	31
Figura 4.15. Leitura da densidade ótica durante dos crescimentos das culturas isoladas.	32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Estudos com utilização de microrganismos para a recuperação avançada de petróleo.....	4
Tabela 3.1. Lista de reagentes necessários para a preparação dos meios	14
Tabela 3.2. Outros reagentes utilizados e respetivo(s) método(s).....	15
Tabela 3.3. Equipamentos utilizados em laboratório e método(s) utilizado(s) correspondente(s).....	16
Tabela 4.1. Crescimentos realizados ao longo do trabalho, condições existentes e densidade ótica máxima obtida.	22

SIGLAS E ABREVIATURAS

CEOR	Recuperação Avançada de Petróleo por Métodos Químicos
DO	Densidade ótica
EOR	Recuperação Avançada de Petróleo
LB	Luria-Bertani
MEOR	Recuperação Avançada de Petróleo Melhorada por Microrganismos
MIC	Corrosão Influenciada Microbiologicamente
OOIP	Óleo Original <i>in Place</i>
SRB	Bactérias Redutoras de Sulfato

.

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é a principal fonte de energia e está na base no fabrico de inúmeros produtos, essenciais na sociedade dos nossos dias, desde gasolina, plásticos, borrachas, tintas, entre outros. As tecnologias tradicionais apenas conseguem extrair por volta de um terço de volume de petróleo e, portanto, mais de metade do petróleo existente fica retido nos reservatórios. Tal limitação deve-se à baixa permeabilidade do petróleo, bem como elevada viscosidade e tensão interfacial com a fase aquosa.

Surfactantes são moléculas anfifílicas que colocadas na interface da mistura água/óleo, afetam as forças de coesão, reduzindo a tensão superficial e interfacial. Contudo os surfactantes sintéticos são, no entanto, tóxicos e difíceis de degradar no ambiente. A alternativa ecologicamente aceitável é a produção de tensioativos a partir de microrganismos, os biosurfactantes. A recuperação avançada de petróleo melhorada por microrganismos é um processo que tem sido alvo de estudos, nomeadamente a procura de espécies viáveis na produção destes produtos e de substratos economicamente convenientes para uma implementação rentável em larga escala.

Assim sendo, este trabalho visa em primeira instância implementar, pela primeira vez na Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, os métodos utilizados em estudos de recuperação do petróleo através da produção de biosurfactantes por microrganismos, nomeadamente estudar as condições de crescimento das bactérias *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* para a obtenção de biosurfactante; realizar testes de corrosão; construir um modelo com coluna com areia, simulando um reservatório petrolífero para avaliar a influência dos biosurfactantes na recuperação do petróleo; e isolar culturas viáveis para síntese de biosurfactante, a partir de comunidades bacterianas existentes numa amostra de areia contaminada por petróleo.

Este trabalho tem particular interesse para a escola, dado ser uma aplicação biotecnológica na produção do petróleo, sendo por isso importante para os estudantes e docentes, quer das licenciaturas em Tecnologias do Petróleo, Engenharia Química e Biotecnologia, quer do Mestrado em Engenharia Biológica e Química, permitindo uma sinergia entre os vários cursos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PETRÓLEO E INTERESSE ECONÓMICO

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos que pode ser classificada em três compostos principais, sendo eles parafinas, naftenos e aromáticos. Estes hidrocarbonetos contêm heteroátomos, tais como enxofre, azoto, oxigénio e metais. O petróleo é considerado uma fonte de energia essencial e indispensável nas sociedades atuais, sendo a fonte principal na produção de combustíveis [1].

Apesar da recente aposta nas energias renováveis, o mundo ainda está dependente do petróleo e dos seus derivados. Investigações decorrem a nível global na tentativa de desenvolver alternativas na recuperação de maiores quantidades de crude, o que ajudaria na estabilização do preço do petróleo no mercado global e diminuição da dependência de muitos países a nível energético. A tecnologia mais promissora é a Recuperação Avançada de Petróleo Melhorada por Microrganismos, tal como o nome indica, os microrganismos estão envolvidos nas técnicas de recuperação, pelos produtos produzidos e pelo conteúdo celular [2].

2.2. FASES DE EXTRAÇÃO DO PETRÓLEO

Numa fase inicial, o petróleo é obtido através da pressão natural existente no reservatório, designada por fase primária. Quando essa pressão sofre uma queda significativa, o fluxo de petróleo é limitado, não alcançando a superfície. A fim de estabelecer a pressão original, os reservatórios são preenchidos por um fluido, através da injeção de água ou de gases, tais como dióxido de carbono, azoto ou gás natural. A esta etapa do processo de extração dá-se o nome de fase secundária [3]. A fase primária permite recuperar apenas 5 a 10%, enquanto que a recuperação da fase secundária é variável, variando de 10 a 40%. Assim, apenas cerca de um terço do volume de petróleo existente no reservatório, antes do início da produção, consegue ser explorado [2]. Os fatores responsáveis por estas limitações são a baixa permeabilidade, elevada viscosidade e tensão interfacial entre o hidrocarboneto e a fase aquosa, causando a retenção do petróleo nos poros rochosos dentro do reservatório [4].

Apesar das reservas petrolíferas abandonadas serem consideradas esgotadas, mais de metade do crude não foi efetivamente retirado. As técnicas de Recuperação Avançada de Petróleo (EOR) têm despertado muito interesse às grandes empresas e aos investigadores.

2.3. TÉCNICAS DE RECUPERAÇÃO TERCIÁRIAS

Nos últimos anos tem-se procurado alternativas para satisfazer as necessidades energéticas no futuro. Com este objetivo as técnicas de recuperação terciárias, conhecidas como Recuperação Avançada de Petróleo por Métodos Químicos, *Chemical Enhanced Oil Recovery* (CEOR) podem ser uma possibilidade. A CEOR inclui o uso de surfactantes, polímeros, ácidos, gases e solventes que conseguem alterar as propriedades do petróleo de forma este ser mais facilmente extraído. Os surfactantes reduzem a tensão interfacial entre as interfaces petróleo/água e petróleo/rocha, diminuindo as forças capilares que dificultam o movimento do petróleo através dos poros rochosos. Adicionalmente, reduzem a molhabilidade, isto é, reduzem a capacidade de se manter em contacto com as superfícies rochosas. Os polímeros aumentam a viscosidade da água em operações de inundação, podendo obstruir zonas com menos petróleo, direcionando a água para canais ricos em petróleo. Os ácidos são usados para aumentar a permeabilidade através da rede de poros. Os gases e solventes baixam a viscosidade do petróleo, promovendo o seu fluxo e os gases aumentam a pressão no reservatório. De um modo geral, aproximadamente 30% do petróleo pode ser recuperado por Métodos Químicos. No entanto, para além de ser economicamente dispendioso, afeta negativamente o ambiente [4].

A Recuperação Avançada de Petróleo Melhorada por Microrganismos, do termo inglês *Microbial Enhanced Oil Recovery* (MEOR) é outro método terciário que reforça a taxa de recuperação do petróleo, por potenciar os microrganismos ou seus produtos, em reservatórios dados como esgotados pela recuperação primária e secundária. A utilização de bactérias para aumentar a extração do petróleo foi proposta pela primeira vez em 1926, por Beckman. Os estudos efetuados por ZoBell, em 1947, geraram muito interesse a nível global, tendo desencadeado a realização de inúmeros testes em campo e em laboratório. Apesar de bastante promissores, os estudos foram suspensos durante a década de 70, por motivos económicos. Surgiu novamente o interesse pelo tema nas últimas duas décadas, com o objetivo de encontrar um método de alto desempenho e economicamente rentável [5].

As bactérias podem contribuir na recuperação do petróleo das seguintes formas:

- Biodegradação do crude: as bactérias degradam os hidrocarbonetos pesados. Assim, o petróleo torna-se mais leve e valioso, como resultado da diminuição da viscosidade;
- Produção de gases: os gases sintetizados pelas bactérias (nomeadamente CO₂, N₂, H₂ e CH₄) podem atuar de duas formas distintas: dissolvendo o crude, e consequente redução da viscosidade ou aumentando a pressão no reservatório;
- Produção de químicos: compostos que podem ser úteis tais como ácidos orgânicos, álcoois, solventes, surfactantes e polímeros;
- Obstrução seletiva: os polímeros ou as próprias bactérias reduzem a permeabilidade em zonas altamente permeáveis ou de canais de água que se formam em reservatórios heterogêneos;
- Outros: as bactérias auxiliam também no controlo de bactérias indesejáveis, como é comum das bactérias redutoras de sulfato (SRB). Adicionalmente atuam para a biodegradação de efluentes tóxicos [5].

Na tabela 2.1 estão agrupados vários estudos consoante a forma de recuperação do petróleo e exemplos de microrganismos utilizados.

Tabela 2.1. Estudos com utilização de microrganismos para a recuperação avançada de petróleo.

Produto		Microrganismo	Efeito	Ref.
Biosurfactante	Não especificado	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Emulsificação e redução da tensão superficial	6
	Não especificado	<i>Enterobacter cloacae</i>	Alteração na molhabilidade	7
	Não especificado	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Redução da tensão superficial	8
	Não especificado	<i>Serratia marcescens</i>	Redução da tensão superficial	9
	Trealose	<i>Mycobacterium sp.</i>	Redução da tensão superficial	10
	Soforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i> , <i>T. petroleum</i>	Emulsificação, redução da tensão superficial	11, 12
	Manosileritritol	<i>Candida antarctica</i> e <i>Candida sp.</i>	Redução da tensão superficial e interfacial	13, 14
	Surfactante particulado	<i>Acinetobacter sp.</i>	Formação de microemulsão	15
Biomassa		<i>Bacillus subtilis</i>	Degradação de hidrocarbonetos pesados	4
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Aumento de pressão	16

Biopolímero	Dextrano	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Controlo de mobilidade, aumento de pressão	16
	Levana	<i>Bacillus licheniformis</i>	Obstrução seletiva	17
	Goma Xantana	<i>Xanthomonas campestris</i>	Redução de permeabilidade	18
Gases	CO ₂	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Diminuição da viscosidade, repressurização	5
	CH ₄ , H ₂	<i>Clostridium, Enterobacter, Methanobacterium spp.</i>	Repressurização, inchamento, redução da tensão interfacial e da viscosidade	19, 20
Solventes	Acetona, butanol, propan-2-diol	<i>Clostridium, Zymomonas, Klebsiella sp.</i>	Dissolução de rocha carbonatada e redução da viscosidade	20, 21, 22
	Ácidos butírico e propanóico	<i>Clostridium spp., Enterobacter spp., mistura de espécies acidogénicas</i>	Aumento de permeabilidade e grau de emulsificação	19, 20, 23

Os biosurfactantes pelas suas propriedades podem ser aplicadas na MEOR, bem como em limpeza de derrames petrolíferos, na remoção de resíduos derivados do petróleo em tanques de armazenamento e na biorremediação dos solos. São bons substitutos de surfactantes químicos devido à sua atividade específica, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e efetivo em condições extremas de temperatura, pressão, pH e salinidade [6].

2.4. BIOSURFACTANTES

Os surfactantes têm a capacidade de se acumular nas interfaces, reduzindo as forças de coesão entre moléculas que partilham o mesmo centro de massa e, consequentemente reduzem a tensão superficial. A tensão superficial é definida como uma força por unidade de comprimento que impede a rutura da superfície de contacto entre duas fases. Quando forças são aplicadas na interface entre um líquido e um gás denomina-se tensão superficial. Enquanto que as forças aplicadas na interface entre dois líquidos denominam-se tensão interfacial. Na figura 2.1 encontram-se representados esses dois tipos de forças. De um modo geral, a tensão superficial diminui com o aumento da temperatura [25].

De todos os líquidos a água tem a maior tensão superficial, cujo valor é 72 dyne/cm ou 72 mN/m, para uma temperatura de 20°C [26].

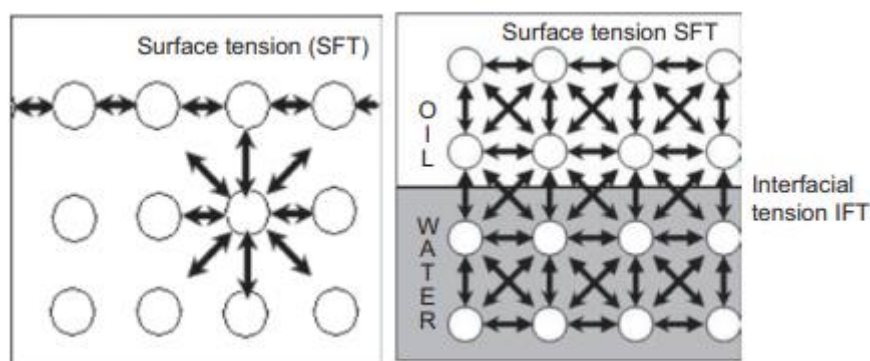


Figura 2.1. Forças de tensão superficial e interfacial exercidas numa interface água/óleo [26].

Os biosurfactantes são moléculas anfífilas, isto é, possuem tanto características hidrofílicas como hidrofóbicas, produzidos por microrganismos (bactérias, leveduras e fungos), pelo que consistem em matérias celulares, tais como glicolípidos, lipopéptidos e ácidos gordos. A grande vantagem face aos surfactantes químicos é a sua aceitação ecológica [24].

2.4.1. Classificação dos biosurfactantes

Pela composição química e tipo de microrganismos produtores, os biosurfactantes estão divididos em cinco grupos: glicolípidos, lipopéptidos e lipoproteínas, ácidos gordos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados [27].

2.4.1.1 Glicolípidos

Os glicolípidos são carboidratos com ligação mono-, di-, tri- e tetrasacáridos, que incluem glucose, manose, galactose, ácido glicurónico, ramnose e sulfato de galactose ligados a cadeias longas de ácidos alifáticos ou a ácidos hidroxialifáticos.

Trealolípidos, ramnolípidos, soforolípidos, diglicosil diglicerídeos e manosileritritol lípidos são os principais exemplos incluídos no grupo dos glicolípidos [27].

Algumas espécies de *Pseudomonas* caracterizam-se por produzirem grandes quantidades de biosurfactante contendo uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido beta-hidroxidecanóico. Um glicolípidio contendo duas unidades de ramnose e de ácido beta-hidroxidecanóico foi sintetizado pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* [28]. Atualmente, ramnolípidos (figura 2.2.A) produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são comercializados pela empresa Jeneil Biosurfactant, nos Estados Unidos da América e são destinados para atividades de biorremediação e agrícolas, por terem ação fungicida [29].

A trealose ligada ao carbono C-6 e C-6' de ácidos micólicos está associada a muitas das espécies de *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Corynebacterium* [10]. Os ácidos micólicos são ácidos gordos compostos por uma cadeia beta-hidróxi com uma cadeia longa lateral alfa. Trealolípidos (figura 2.2.B) existentes em diferentes organismos diferem na estrutura e tamanho dos ácidos micólicos, no número de átomos de carbono e não grau de insaturação [27]. Os dimicolatos de trealose são produzidos por *Rhodococcus erythropolis* [30].

Os soforolípidos (figura 2.2.C) consistem numa soforose dimérica carbohidratada ligada a um grupo hidroxilo de um ácido gordo e são produzidas principalmente por leveduras tais como *Torulopsis bombicola*, *T. apícola*, *Centrolene petrophilum*, *Rhodotorula bogoriensis* e *Wickerhamiella domericqiae* [31]. Adicionalmente, *T. petrophilum* produz soforolípidos em substratos insolúveis com a água, em óleo vegetal e em vários alcanos [32]. Este glicolípidio faz reduzir a tensão superficial da água de 72,8 mN/m para 30 mN/m, com uma concentração micelar crítica de 40 a 100 mg/l.

O manosileritritol é um açúcar sintetizado pelas leveduras *Candida antarctica* e *Candida sp.* SY 16. O manosileritritol produzido pela última reduz a tensão superficial da água para 29 dyne/cm a uma concentração micelar crítica de 10 mg/l [14]. O componente dos ácidos gordos no biosurfactante foi identificado como ácidos hexanóicos, dodecanóicos, tetradecanóicos e tetradecenóico. Outros relatos da síntese deste composto incluem as leveduras *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma antarctica* e *Pseudozyma rugulosa* [33].

2.4.1.2 Lipopéptidos

A surfactina (figura 2.2.D), um lipopéptido cíclico, é um dos biosurfactantes mais eficazes conhecidos até agora, identificado pela primeira como produto da estirpe da bactéria *B. subtilis* ATCC-21332 [34]. A surfactina reduz a tensão superficial da água de 72 para 27,9 mN/m com uma concentração micelar crítica de 17 mg/l. Estudos recentes provam que a surfactina tem efeito antiviral, anti-coplasma, antitumoral, anticoagulante bem como inibidor enzimático [27].

A iturina foi descoberta por uma estirpe de *Bacillus subtilis* recolhida de um solo em Ituri, República do Congo [35]. Consiste em lipoheptapéptidos cíclicos cuja cadeia lateral consiste num beta-amino ácido gordo.

A fengicina é um lipodecapéptido cuja cadeia lateral é um ácido gordo beta-hidróxi. A identificação de homólogos de fengicina foi produzida por *B. subtilis* [36].

A liquenisina, produzida por *Bacillus licheniformis*, apresenta uma estrutura e propriedades semelhantes comparativamente à surfactina [37]. Este lipopéptido é estável numa ampla gama de pH, temperatura e concentração de NaCl.

2.4.1.3 Ácidos gordos

Alguns microrganismos com capacidade em degradar hidrocarbonetos e produzem ácidos gordos livres a nível extracelular quando crescem em alcanos. São ácidos gordos saturados no carbono C12 a C14 e contém grupos hidroxilo e ramificações alquil. As estirpes de bactérias *Arthobacter* AK19 [38] e *P. aeruginosa* 44T1 [39] acumularam cerca de 40 e 80%, em massa, destes lípidos quando cultivadas em hexadecano e em azeite, respetivamente.

2.4.1.4 Surfactantes Poliméricos

Os biosurfactantes poliméricos são biopolímeros de elevado peso molecular, cujas propriedades incluem elevada viscosidade, resistência à tração e tensão de corte.

A estirpe *Acinebacter calcoaceticus* RAG-1 produz um potente bioemulsificante denominado *emulsan* [40]. É caracterizado como heteropolissacárido polianiónico anfipático. Consiste em unidades repetitivas de trissacarídeo de N-acetil-D-galactosamina, N-acetylgalactosamina de ácido urónico e N-acetilamino de um açúcar não identificado.

A estirpe bacteriana *A. calcoaceticus* A2 produz uma substância dispersante tensioativa, designado biodispersano. O componente ativo de superfície é um heteropolissacárido aniónico com um peso molecular médio de 51400 (g/mol) e contém glucosamina, 6-metilaminohexose, ácidos urónicos de galactosamina e um amino-açúcar não identificado [41].

Alasan é uma alanina aniónica produzida pela estirpe *A. Radioresistens* KA53, com capacidade para solubilizar e degradar hidrocarbonetos poliaromáticos [42].

Liposan é composto em 83% (m/m) por carboidratos e 17% (m/m) por proteínas. É produzido extracelularmente por *C. lipolytica*. Os carboidratos presentes são polissacáridos à base de glucose, galactose, galactosamina e ácido galacturónico [43].

2.4.1.5 Surfactantes Particulados

Os biosurfactantes particulados (figura 2.2.E) são vesículas membranares de células microbianas, que emulsificam hidrocarbonetos. Foram registadas células de estirpes de

Acinetobacter sp. HO1N com vesículas membranares de 20 a 50 mm de diâmetro e uma densidade flutuante de 1,158 g/cm³ [44].

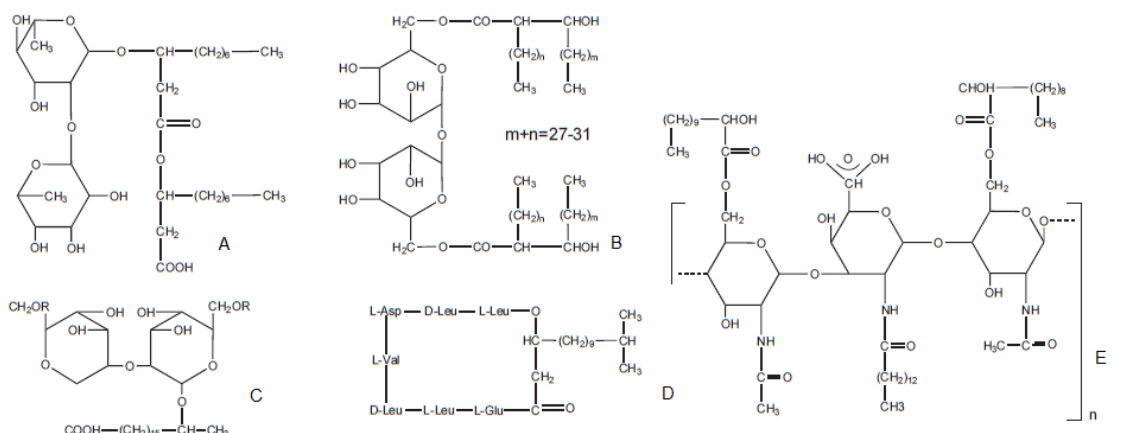


Figura 2.2. Estrutura química de diferentes biosurfactantes. A) ramnolípido; B) trealolípido; C) soforolípido; D) surfactina; E) surfactante particulado [45].

2.4.2 Aplicações

A localização e o tamanho dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos afetam as propriedades de um surfactante, que por sua vez direcionam a aplicação prática de surfactantes em várias aplicações industriais relacionadas com detergentes, recuperação de petróleo, cosméticos, alimentos, farmacêuticos e agricultura. O seu interesse tem vindo a aumentar como alternativa aos surfactantes sintéticos e prevê-se que tenha grande impacto em aplicações industriais e ambientais nas gerações futuras [25].

As contaminações ambientais causadas pelas atividades indústrias, libertam componentes orgânicos e inorgânicos que facilmente se aderem ao solo. A aplicação dos biosurfactantes na remediação dos componentes orgânicos, tais como os hidrocarbonetos, foca-se em aumentar a biodisponibilidade ou mobilizar e remover os contaminantes por pseudosolubilização e emulsificação durante um tratamento de limpeza [29].

A nível da indústria petrolífera, a grande aplicação está na recuperação do petróleo. Visto que as tecnologias tradicionais conseguem extrair perto de 40 % face ao óleo original *in place* (OOIP), a implementação de agentes tensioativos produzidos por microrganismos tem sido extensivamente estudada.

Diferentes estratégias são aplicadas na MEOR: produção de biosurfactantes em reatores *offsite* e consequente adição nos reservatórios petrolíferos, produção de biosurfactantes por injeção de espécies indígenas, injeção de nutrientes no reservatório para estimular a produção de biosurfactantes por bactérias indígenas.

Até ao momento, a primeira estratégia é a mais explorada. O grande inconveniente na produção *in situ* em reservatórios está na dificuldade no isolamento de estirpes que se adaptem em ambientes extremos nos reservatórios, como altas pressões, salinidade e temperaturas a atingirem os 85°C [29].

Várias investigações em laboratório foram realizadas para avaliar a extração do petróleo na presença de biosurfactantes. Estes produzidos por *R. erythropolis* e *Rhodococcus ruber* apresentaram propriedades que permitiam a extração de hidrocarbonetos em jazidas de xisto localizadas na Jordânia, com uma recuperação de 25% e 26% (resultados laboratoriais), respetivamente, quando pré-tratado com peróxido de hidrogénio, por este enfraquecer as ligações químicas entre os componentes do querosene. Estes biosurfactantes conseguem formar micelas nas zonas hidrofílicas ou hidrofóbicas, dependendo das fontes de carbono. A ação das micelas aumenta a solubilidade dos hidrocarbonetos, reduz a tensão interfacial entre as fases aquosa e não aquosa e, consequentemente, aumenta a área da superfície de contacto [46].

2.5. CORROSÃO

A corrosão é um processo eletroquímico que ocorre quando um metal está exposto a certo ambiente. Consiste na deterioração do metal através de uma reação de oxidação-redução, na qual o metal é oxidado pela libertação de eletrões, atuando como um ânodo. A corrosão é um processo que afeta severamente a indústria petrolífera, dadas as condições extremas de trabalho a que os metais estão sujeitos e ficam expostos [47].

A corrosão pode ser caracterizada como externa e interna. A corrosão interna é aquela que tem lugar dentro de tanques, tubagens e caldeiras, ou seja, dos equipamentos. Está associada ao transporte de fluidos e hidrocarbonetos que contêm agentes corrosivos. A corrosão externa está relacionada com a exposição a ambientes corrosivos. Em ambas, como resultado dá-se a oxidação de superfícies do metal. Os fatores mais comuns são a água do mar, temperatura, humidade, chuva, agentes agressivos como cloretos e sulfuretos e microrganismos [47].

Os agentes corrosivos mais comuns na indústria petrolífera são o dióxido de carbono e sulfureto de hidrogénio [24]. O dióxido de carbono ao entrar em contacto com a água resulta na formação de ácido carbónico. Qualquer ácido em contacto com metal vai dissolver a camada de óxido e consequentemente promove o processo de oxidação-redução. Esta reação é designada de “*sweet corrosion*” dada a interação do ácido carbónico com aço de baixo carbono. O sulfureto de hidrogénio é produzido no processo metabólico de bactérias anaeróbias. As bactérias na presença de sulfatos provocam uma reação eletroquímica em que o sulfato é reduzido a sulfureto. Este gás tem a capacidade em se difundir pelos limites de grão diminuindo a maleabilidade do metal, tornando-o frágil e eventualmente leva à sua ruptura.

Uma vez que põe em causa a segurança e acarreta prejuízos económicos, torna-se necessária monitorizar a velocidade de corrosão e prever o desenvolvimento das várias formas de corrosão, em especial destaque para a corrosão por picadas e biocorrosão. [47].

2.5.1. Corrosão por picadas

A corrosão por picadas ou por pits, é uma corrosão localizada na qual o metal é dissolvido, apresentando picadas ou pequenos buracos. As picadas (figura 2.3) formam-se com diferentes aspectos: largos, superficiais, estreitos, profundos, entre outros. Na presença de água, o ferro é oxidado a Fe^{2+} , causando a libertação de dois elétrons. Os elétrons, em conjunto com oxigénio formam iões OH^- , que por sua vez reage com o ferro na sua forma oxidada para gerar óxido de ferro hidratado ($\text{Fe}(\text{OH})_2$), ou conhecido vulgarmente por ferrugem [48].

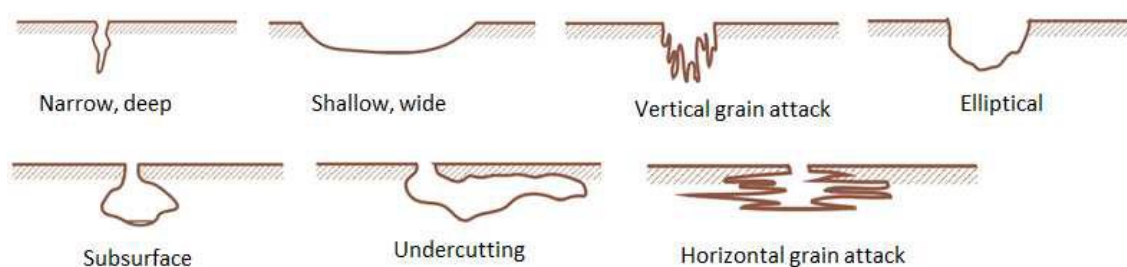


Figura 2.3. Representação da aparência de picadas na corrosão [49].

A previsão quanto ao desenvolvimento desta forma de corrosão é dificultada, mas a presença de arranhões ou amolgadelas aumenta o risco de desenvolver picadas. Material com revestimento danificado, apresenta-se vulnerável a picadas.

Este tipo de corrosão é perigoso devida à dificuldade em observar as picadas numa fase inicial, devido ao seu tamanho e por estarem cobertas por substâncias corrosivas [47].

2.5.2 Corrosão por erosão

A corrosão por erosão é um ataque à superfície do metal como resultado do movimento de fluidos. Ocorre pela interação entre as partículas sólidas, o fluido corrosivo e o material em causa, nomeadamente em soldadura de tubagens. O gotejamento na solda de tubos cria uma turbulência no interior, e uma vez que o fluido contém partículas abrasivas, estas vão desgastar e levar à degradação do material exposto nessas zonas de maior turbulência.

Um material de maior dureza não significa ser, necessariamente, a solução para a corrosão por erosão. Este ataque pode ser prevenido reduzindo a velocidade do fluido, de modo a circular em fluxo laminar. Como medidas de prevenção a este tipo de corrosão, recomenda-se a utilização de tubagens com diâmetros de maiores dimensões, a fim de aumentar o tempo de vida de um metal, bem como a seleção de superfícies menos rugosas para eliminar possíveis ângulos de colisão entre as partículas [47].

2.5.3 Corrosão galvânica

A corrosão galvânica é um fenómeno que se dá na presença de dois metais com diferentes potenciais, na qual um deles é menos resistente à corrosão. Os metais estando em contacto com uma solução eletrolítica, geram um circuito por onde circulam os eletrões. A taxa da corrosão galvânica depende do potencial de corrosão do ânodo e do cátodo, ou seja, do metal menos resistente e do metal mais resistente à corrosão, respetivamente e da área de superfície relativas, o que significa que se a superfície de contacto do ânodo for inferior à superfície do cátodo, o risco de corrosão é significativamente elevado. Portanto, durante a utilização de dois metais distintos ligados, há que considerar aumentar a área superficial do ânodo face à do cátodo. É importante, também, saber selecionar metais cuja diferença de potencial seja mínima [50].

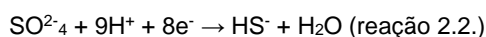
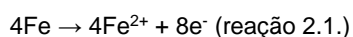
2.5.4 Biocorrosão

A corrosão influenciada microbiologicamente, *microbiologically influenced corrosion* (MIC) ou biocorrosão é a degradação do material promovida por atividades microbianas. De todos os materiais metálicos, o aço carbono é o mais vulnerável à MIC. Como o aço carbono é muito utilizado em tanques de armazenamento e tubagens para transporte de fluidos a biocorrosão deve ser sempre prevista, porque de facto estas estruturas estão expostas ao crescimento de inúmeros microrganismos.

Os microrganismos considerados MIC são bactérias redutoras de sulfato, bactérias redutoras de tiosulfato, acetogénios, metanogénos, oxidantes de ferro, redutores de ferro e bactérias fermentadoras.

Há dois mecanismos caracterizados pela ação destes microrganismos: MIC química/metabólica, em que os microrganismos indiretamente degradam o metal através da produção de metabolitos corrosivos, tais como ácidos orgânicos e sulfureto de hidrogénio, e MIC elétrica/por transferência extracelular de eletrões, na qual as espécies anaeróbias atacam diretamente e consomem os eletrões do metal. O caso mais comum são as bactérias redutoras de sulfato, do inglês *Sulfate-Reducing Bacteria* (SRB). As SRB estão presentes, quer em ambientes aquosos, quer em ambientes terrestres. Na presença de crude, utilizam o sulfato como aceitador de eletrões para gerar sulfureto de hidrogénio (figura 2.4.) [51].

As reações de dissolução do ferro (reação anódica) e a redução do sulfato (reação catódica) e a reação global são as seguintes:



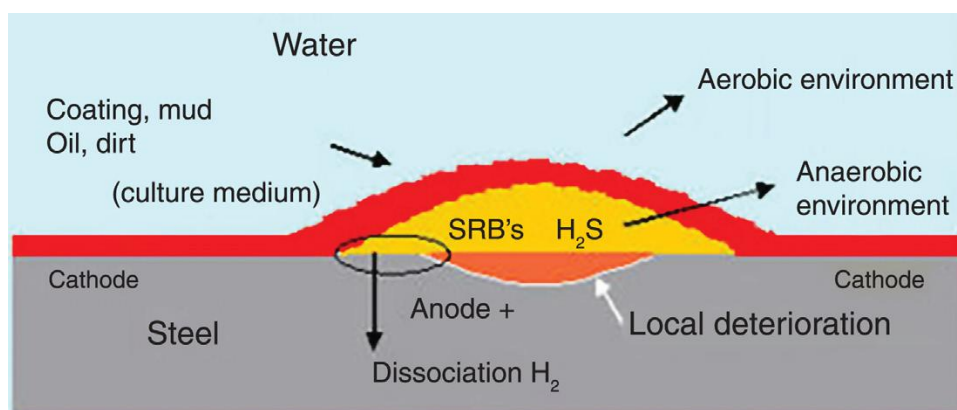


Figura 2.4. A ação das Bactérias Redutoras de Sulfato no aço [47].

A presença das SRB também influencia o pH e concentração de oxigênio do meio, aumentando os ataques localizados, nomeadamente por picadas [47].

A MIC pode ocorrer em qualquer ambiente aquoso, sendo um problema frequente nas indústrias petrolíferas dada a presença dos microrganismos e dos seus subprodutos. Um problema associado às indústrias petrolíferas são os derrames. Estudos realizados procuram explorar mais pormenorizadamente as condições que promovem a corrosão bem como a procura de alternativas para minimizar esses efeitos.

Na bibliografia, pode encontrar-se a descrição de vários casos de degradação de metais por MIC.

Uma tubagem com um comprimento de 25 km para transporte de crude, numa indústria petrolífera localizada na Arábia Saudita deteriorou após três anos de operação. O metal, identificado como aço carbono C1018, foi afetado pela corrosão em oito áreas distintas, com formação de furos. A velocidade de circulação do fluido correspondia a 40% da velocidade máxima admissível na tubagem. A esta velocidade, gotículas de água ficaram retidas em algumas zonas da tubagem, promovendo a atividade corrosiva das bactérias, tendo as SRB sido as principais responsáveis [52].

Outro caso de derrame ocorreu numa tubagem numa indústria em Cangzhou, China. Uma seção, não afetada dessa tubagem, contendo uma pequena camada de depósitos foi recolhida para ser sujeita a testes. Essa amostra, de aço carbono Q235, foi analisada durante 90 dias. Sinais de corrosão começaram-se a observar ao fim de 45 dias e nos últimos 30 dias foi quando se verificou uma maior intensidade. No final, a amostra estava severamente afetada por picadas. Analisou-se, também, que a comunidade predominante no biofilme no final do ensaio era *Methanobacterium spp.* e concluiu-se que a corrosão era devida diretamente pela presença de microrganismos por transferência de eletrões [51].

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS E REAGENTES

Os microrganismos utilizados foram estirpes comerciais de *Bacillus cereus* ATCC10876 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027.

Na tabela 3.1 encontram-se listados os reagentes utilizados para a preparação de soluções e meios de crescimento e respectivas marcas.

Tabela 3.1. Lista de reagentes necessários para a preparação dos meios

Meio/Solução	Reagentes	Marca/Grau de pureza
A	MgSO ₄	Sigma; ≥99,5 % (KT)
B	(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma; 99,0 %
C	EDTA	Alfa Aesar
	MnSO ₄ .H ₂ O	Riedel-de HÄEN; min 99 %
	NaCl	José Manuel Gomes dos Santos, LDA; 99,0 %
	CaCl ₂ .2H ₂ O	José Manuel Gomes dos Santos, LDA; 78,3 %
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Panreac; 99,5 – 103,0 %
	FeSO ₄ .7H ₂ O	Merck KGaA; min 99,5 %
	CuSO ₄ .5H ₂ O	José Manuel Gomes dos Santos, LDA; 96,3

		% min
	$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	Panreac-AppliChem; 99,0 – 100,5 %
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Chem-Lab; 99,5 %
	Ácido bórico	José Manuel Gomes dos Santos, LDA; 99,9 – 100,2 %
	Na_2SeO_4	Alfa Aesar; 99,8+%
	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Aldrich; 98 %
E	KH_2PO_4	Sigma-Aldrich; $\geq 99,0$ %
	K_2HPO_4	Sigma-Aldrich; ≥ 98 %
	Sacarose	Sigma; $\geq 99,5$ % (GC)
	NaCl	José Manuel Gomes dos Santos, LDA; 99,0 %
	Extrato de levedura	Prolabo-VWR Chemicals
	NaNO_3	Panreac; min 99,0 %

Na tabela 3.2 encontram-se descritos outros reagentes, e respetivas marcas, utilizados nos diferentes métodos.

Tabela 3.2. Outros reagentes utilizados e respetivo(s) método(s)

Reagentes	Método aplicado
Agar Nutritivo (Himedia)	

Luria-Bertani (LB) (nzytech)	Crescimento bacteriano; isolamento de bactérias
Ácido clorídrico 3M	
Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)	Teste da glucose
Ácido clorídrico 0,5M	

3.2. EQUIPAMENTOS

Na tabela 3.3 encontram-se descritos os equipamentos utilizados.

Tabela 3.3. Equipamentos utilizados em laboratório e método(s) utilizado(s) correspondente(s)

Equipamento	Método aplicado
Autoclave (Uniclave 88)	Crescimento bacteriano; isolamento de bactérias
Balança digital (sartorius)	Crescimento bacteriano; isolamento de bactérias
Estufa	Crescimento bacteriano; isolamento de bactérias
Agitador Orbital ES-20 (GrantBio)	Crescimento bacteriano; isolamento de bactérias
Espetrofotômetro UV-1800 (Shimadzu)	Crescimento bacteriano; teste da glucose; isolamento de bactérias
Centrífuga (Hettich)	Crescimento bacteriano; isolamento de bactérias
Medidor de pH (METTLER TOLEDO)	Crescimento bacteriano; isolamento de bactérias

Banho-maria laboratorial	Teste da glucose
Goniómetro	Medição da tensão superficial
Bomba ISM 830 (ISMATEC)	Construção de uma coluna preenchida com areia
Peneiros	Construção de uma coluna preenchida com areia; isolamento de bactérias

3.3 MÉTODOS

3.3.1. Crescimento bacteriano

As bactérias utilizadas na realização deste trabalho foram *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* devido à sua capacidade em sintetizar biosurfactantes de acordo com vários estudos, nomeadamente um estudo realizado por Amani, H. *et al* [6] com estas bactérias isoladas em solos de campos petrolíferos do Irão.

As preparações dos meios foram as seguintes:

- Meio A: pesou-se 5,0 g de MgSO_4 e adicionou-se água destilada até completar 200 ml;
- Meio B: pesou-se 20,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e adicionou-se água destilada até completar 200 ml;
- Meio C: pesou-se 0,50 g de EDTA; 3,0 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,0 g de NaCl; 0,10 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,10 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,10 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,010 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,010 g de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$; 0,010 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,010 g de ácido bórico; 0,0050 g de Na_2SeO_4 e 0,0030 g de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Adicionou-se água destilada até completar 1000 ml;
- Meio E: pesou-se 0,675 g de KH_2PO_4 ; 3,475 g de K_2HPO_4 ; 2,50 g de sacarose; 12,50 g de NaCl; 0,125 g de extrato de levedura e 0,250 g de NaNO_3 . Adicionou-se água destilada até completar 250 ml.

As células foram retiradas de crio-frascos e inoculadas nas placas de *petri* de 90 mm com meio de agar nutritivo solidificado. Estas foram expostas a uma temperatura de 37 °C durante 48 h. Após esse período, algumas colónias foram colhidas e colocadas em 50 mL de meio de Luria-Bertani (LB), em erlenmeyers de 250 mL (previamente esterilizados numa autoclave a 121 °C durante 15 min) e colocados no agitador orbital durante 24 h a 37 °C e 150 rpm. Durante este período, foram retiradas amostras, para monitorizar o crescimento microbiano, através das determinações da densidade ótica (DO), a um comprimento de onda de 600 nm. Após 24 h, 5 mL do inóculo foram colocados em erlenmeyers contendo 50 mL de meio E, 2,5 mL de solução A, 2,5 mL de solução B esterilizados e 2,5 mL de solução

C. Os erlenmeyers foram colocados no agitador orbital durante 48 h, a 37 °C e 170 rpm, e o crescimento foi seguido pelas determinações da densidade ótica, diluindo-as com água destilada numa proporção de 1:5, quando necessário de forma ter uma densidade ótica sempre inferior a 1. Os erlenmeyers, bem como o meio E e as soluções A e B foram esterilizadas a 121 ° C durante 15 min, enquanto que a solução C foi filtrada com o auxílio de um filtro de 0,20 µm. Nota que para o primeiro crescimento, o meio C foi não utilizado. Nos crescimentos II e III, os reagentes $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e Na_2SeO_4 não foram adicionados.

Num fim do crescimento, o meio foi transferido para tubos falcon de 50 mL e sujeito a centrifugação a 5000 rpm durante 30 mins. O sobrenadante foi separado do precipitado de forma a separar a biomassa, e o pH do meio foi corrigido para 2,0 adicionando uma solução de ácido clorídrico a 3 M de forma a que o biosurfactante produzido fosse precipitado. O conteúdo foi novamente centrifugado a 5000 rpm durante 30 mins, a fim de se obter o biosurfactante. O procedimento do crescimento bacteriano e separação do biosurfactante foi adaptado do descrito por Amani H. *et al.* [6].

3.3.2 Teste da glucose

O teste da glucose permite monitorizar a concentração de açúcares ao longo do crescimento. O teste da glucose foi realizado apenas no crescimento de *Bacillus cereus*, dado que com esta bactéria atingiram-se valores superiores de densidade ótica (D.O.). É de esperar que a concentração de glucose diminua ao longo do tempo, pois esta deverá ser consumida pelas bactérias. O Teste consiste em adicionar 0,5 ml de amostra, 0,5 ml de HCl 0,01 M (para converter a sacarose em glucose) e 0,5 ml de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em tubos de ensaio. Os tubos foram sujeitos a banho maria a 100 °C durante 7 minutos. Após este período, foram retirados do banho e arrefeceu-se o mais rapidamente possível. Adicionou-se 5 ml de água destilada e leu-se a absorvância a 540 nm. [53].

3.3.3 Ensaio de propagação do petróleo

O método de propagação do petróleo é um teste simples que permite detetar a presença de biosurfactante. O método consiste em colocar numa placa de *petri* de 150 mm, 50 ml de água destilada, 10 µl de crude e 10 µl do produto resultante da fermentação. Ao adicionar este último, a presença de biosurfactante espalha o crude e forma uma zona circular, tal como representado na figura 3.1., e assim o teste é considerado como positivo [54].



Figura 3.1. Teste de propagação do petróleo. A presença de uma zona circular incolor confirma a presença de biosurfactante [56].

3.3.4 Análise da emulsificação

O índice de emulsão é avaliado pelo rácio da altura da emulsão com o óleo e água. Adicionou-se 4 ml da solução de biosurfactante e 4 ml de crude num tubo de falcon de 15 ml. O tubo foi agitado em vórtex e posteriormente mantido em repouso durante 24 h. Ao fim desse período, mediu-se a altura da emulsão, óleo e zona aquosa [6].

3.3.5 Medição da tensão superficial

A medição da tensão superficial foi efetuada através de um goniómetro. Este equipamento permite determinar o ângulo de contacto dos meios de crescimento (ao longo do tempo) numa superfície sólida. Na prática, é a tendência do líquido em se espalhar nessa superfície.

O goniómetro (figura 3.2.) está equipado por uma fonte de luz, que incide na câmara de ensaio. Por sua vez o sistema ótico e a câmara de vídeo transmitem a informação para o computador através do software MATLAB. Foi utilizado o método da bolha cativa, pelo simples facto das amostras estarem equilibradas com o meio líquido. Admitiu-se a densidade de $0,988 \text{ g/cm}^3$, por se ter operado à temperatura ambiente [57].

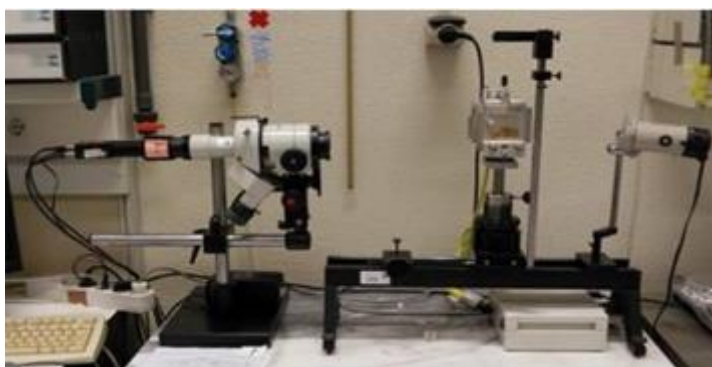


Figura 3.2. Vista geral de todos os componentes que constituem o goniômetro [57].

3.3.6 Construção de um modelo de coluna com areia empacotada

A fim de simular um reservatório petrolífero, foi construído um modelo de uma coluna areia empacotada (figura 3.3.).



Figura 3.3. Coluna preenchida com areia para simulação de um poço petrolífero.

O modelo de coluna foi construído em vidro acrílico de forma cilíndrica, com as seguintes dimensões: 25 cm em comprimento e 3 cm de diâmetro. Na coluna foram fixadas duas tampas de borracha para cobrir as extremidades, após ser introduzida a areia. As tampas foram perfuradas com agulhas, de modo a que estas contactem com o interior da coluna e com os tubos de alimentação (base) e de saída (topo).

Primeiramente, a areia foi peneirada até se obter uma quantidade suficiente para encher totalmente a coluna, com partículas de diâmetro inferior a 0,150 mm. Antes de ser adicionada à coluna, a areia selecionada foi fervida em água. Durante o funcionamento da coluna, a granulometria era de tal forma fina que se depositou na mangueira. Tendo-se optado por usar areia com granulometria superior a 0,150 mm.

3.3.7. Simulação da extração do petróleo

Os fluidos que circularam na coluna foram injetados por uma bomba, em sentido ascendente. Foram realizados quatro enchimentos com os seguintes fluidos:

- Enchimento 1: solução salina 5 g/l;
- Enchimento 2: crude;
- Enchimento 3: solução salina 5 g/l;
- Enchimento 4: solução contendo biosurfactante.

Com este ensaio, pretende-se que o último enchimento recupere uma determinada quantidade de crude, semelhantemente ao método de recuperação terciária.

3.3.8 Teste da corrosão

Para o teste de corrosão, foram pesadas três placas de aço 316 de forma quadrangular de 2 cm de lado e colocadas em copos de vidro. Cada amostra foi mergulhada numa solução distinta: solução 1 continha petróleo, solução 2 continha NaCl 10% e a solução 3 continha biosurfactante e deixadas à temperatura ambiente. As placas foram secas e posteriormente pesadas ao fim de 7 e de 45 dias.

3.3.9 Isolamento de bactérias

Cerca de 100 g de uma amostra de areia contaminada com crude (da coluna usada nos testes de simulação de reservatório de petróleo) foi pesada e mergulhada num meio de sal mineral (6 g/L Na_2HPO_4 ; 3 g/l KH_2PO_4 ; 0,5 NaCl g/l; 1 g/l NH_4Cl ; 0,24 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g/l CaCl_2) e 1 % de crude num erlenmeyer de 250 ml e colocada num agitador orbital a 30 °C e 120 rpm, durante 48 horas. Posteriormente, uma pequena quantidade de solução foi transferida e devidamente espalhada para uma placa de petri e colocada na estufa a 37 °C durante 48 horas. Foram escolhidas quatro colónias de bactérias, separando-as em placas de petri e colocadas na estufa durante 48 horas. A partir daí, foram sujeitas a crescimento celular, tal como no processo 3.3.1 [55].

4. RESULTADOS E ANÁLISE DE RESULTADOS

4.1. CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS

4.1.1 Curvas de crescimento

O crescimento das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* foi monitorizado através da determinação da densidade ótica ao longo dos vários crescimentos.

Na tabela 4.1. estão apresentados os valores das DO máximas obtidos em cada um dos crescimentos realizados.

Tabela 4.1. Crescimentos realizados ao longo do trabalho, condições existentes e densidade ótica máxima obtida.

Crescimento	Microrganismo	Condições	Densidade ótica máxima
I	<i>B. cereus</i>	O meio C não foi adicionado	3,810
	<i>P. aeruginosa</i>		0,525
II	<i>P. aeruginosa</i>	No meio C, os reagentes $AlK(SO_4)_2$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ e Na_2SeO_4 não foram incluídos.	0,790
III	<i>B. cereus</i>	No meio C, os reagentes $AlK(SO_4)_2$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ e Na_2SeO_4 não foram incluídos.	4,425
IV	<i>B. cereus</i>	Todos os meios	1,896
V	<i>B. cereus</i>	Todos os meios	3,670
VI	<i>B. cereus</i>	Todos os meios	3,595

No caso da pré-cultura de *B. cereus* (figura 4.1.), durante a primeira hora sofreu um aumento de DO muito ligeiro, não havendo um crescimento significativo. A partir da primeira hora até à terceira, foi o período de crescimento mais rápido. Da terceira à quinta hora, a taxa de crescimento já não é tão acentuada. A absorvância máxima registada foi de 4,095.

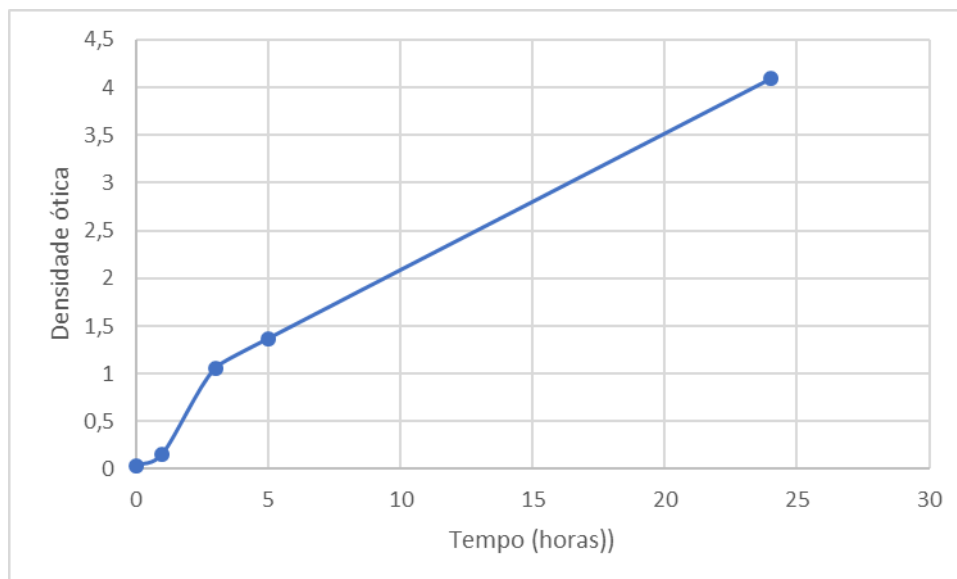


Figura 4.1. Leitura da densidade ótica durante o crescimento III da pré-cultura de *Bacillus cereus*.

Efetuada a transferência de 5 ml do inóculo para o meio E, a adaptação foi mais rápida, evoluindo de um modo algo constante durante após a primeira hora até às 23 horas (figura 4.2. Até ser interrompida o crescimento, há um ligeiro aumento, em que a DO máxima foi de 4,425.

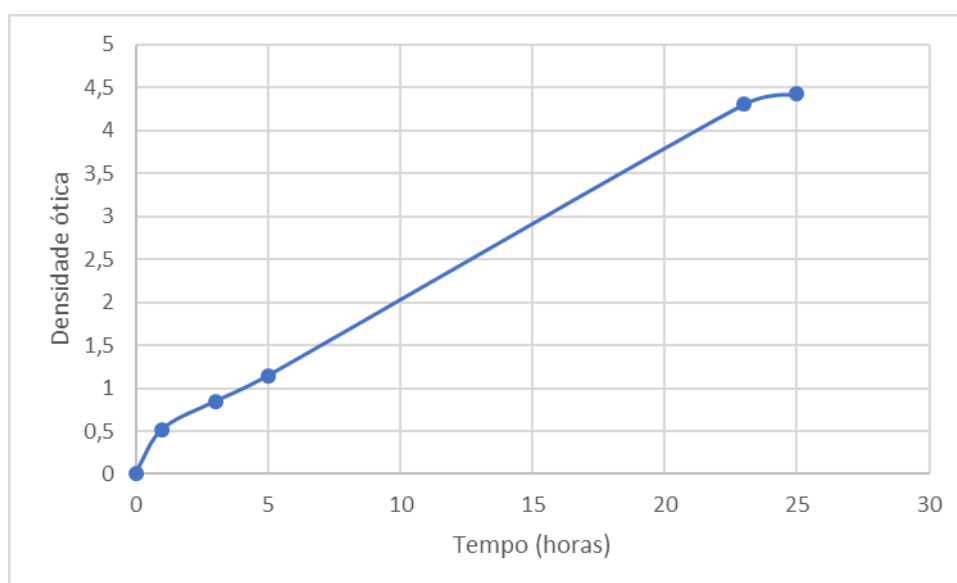


Figura 4.2. Leitura da densidade ótica durante o crescimento III da cultura de *Bacillus cereus*.

Quanto a *P. aeruginosa*, houve uma maior dificuldade na adaptação ao meio LB, na qual o crescimento durante as duas primeiras horas foi nulo (figura 4.3.). Após este período até ser interrompida a fermentação, a curva de crescimento é acentuada. A DO máxima obtida foi de 3,555.

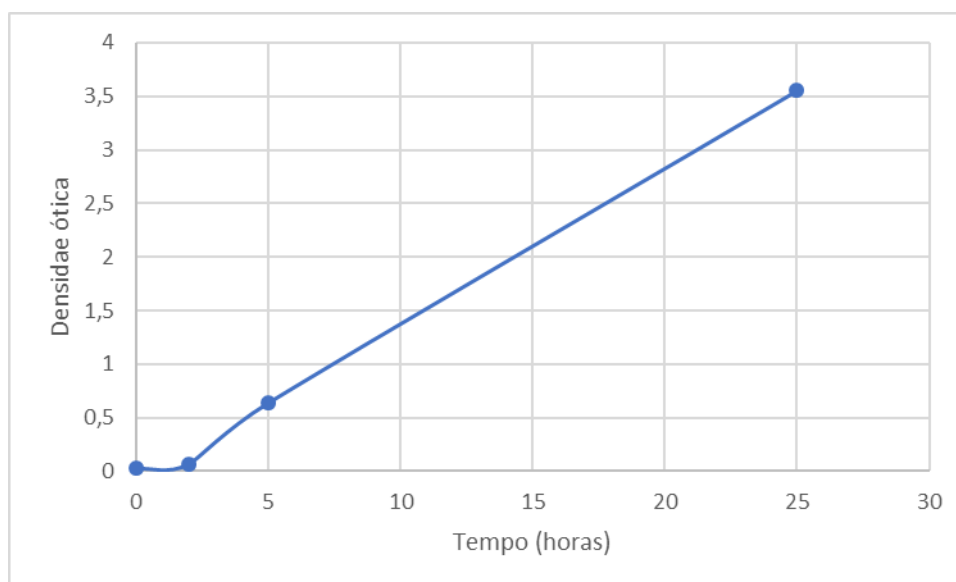


Figura 4.3. Leitura da densidade ótica durante o crescimento II da pré-cultura de *Pseudomonas aeruginosa*.

Contrariamente à fermentação em pré-cultura, no meio E, *P. aeruginosa* sofreu um rápido crescimento nas duas horas iniciais (figura 4.4). Porém, até ao final do crescimento, a variação foi insignificativa. O máximo registrado foi de apenas 0,790, atingido após 24 horas.

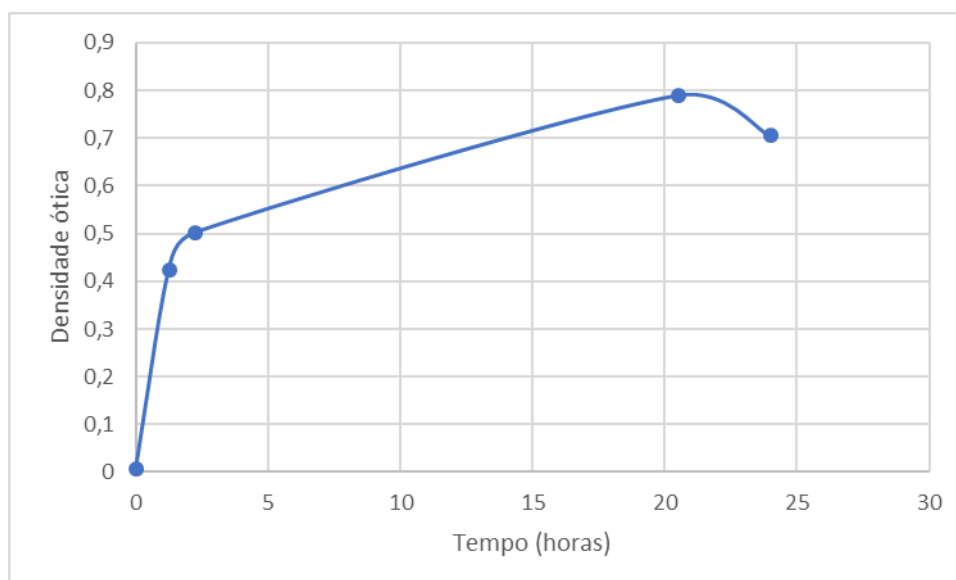


Figura 4.4. Leitura da densidade ótica durante o crescimento II da cultura de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.1.2 Quantificação da glucose ao longo do crescimento

Para a determinação da glucose ao longo do crescimento, foram guardadas amostras do meio de cultura do crescimento V de *Bacillus cereus*, no início e ao fim de 1, 2, 20, 24 e 44 horas. Pela análise da figura 4.2., a evolução da absorvância na fase de cultura o máximo é atingido ao fim de 25 horas, pelo que é de esperar que a quantidade da glucose diminua para valores mínimos coincidentes quando o crescimento máximo, tal como se verifica no trabalho [53]. No entanto, na figura 4.5. onde estão representados os valores da glucose ao longo do tempo, não se consegue fazer qualquer correlação entre o crescimento bacteriano com a variação da concentração da glucose. Especialmente nos primeiros pontos onde se esperava que a quantidade de açúcares fosse mais elevada.

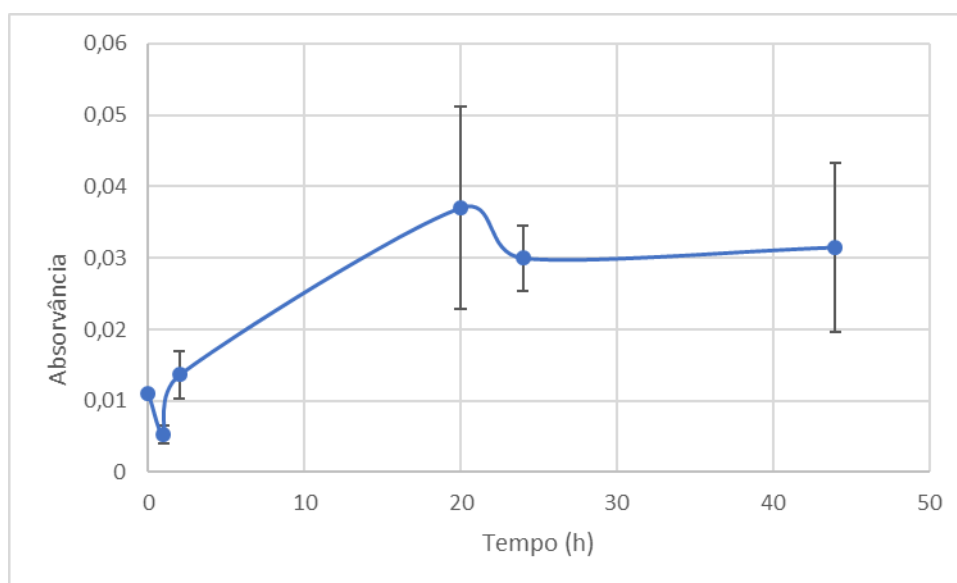


Figura 4.5. Análise espectral da glucose durante o crescimento V de *Bacillus cereus*.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTE

4.2.1 Ensaio de propagação do petróleo

Este ensaio foi realizado com a solução de biosurfactante resultante do crescimento IV de *B. cereus*. Adicionados a água destilada e o crude, esperar-se-ia que com a adição da solução com biosurfactante, se formasse uma zona circular incolor. Através da observação da figura 4.6., tal não se verifica, o que indicia reduzida produção de biosurfactante pelas bactérias. A quantificação do biosurfactante por métodos espectrofotométricos, tal como descrito em Amani, H. *et al* [6] possibilitaria a quantificação dos biosurfactantes produzidos, mas tal não foi possível neste trabalho.



Figura 4.6. Imagem do ensaio de propagação do petróleo na presença da solução de biosurfactante produzido pelas bactérias *B. cereus* do crescimento IV.

4.2.2 Análise de emulsificação

O segundo teste para quantificar a existência de biosurfactante foi realizado através de uma análise de emulsificação. Neste teste foi utilizada a solução de biosurfactante produzida no crescimento IV de *B. cereus*. Adicionadas as quantidades exigidas num tubo falcon e agitadas em vórtex, o tubo foi deixado em repouso durante 24 horas para dar-se a separação e formação das três zonas distintas: emulsão, óleo e água. Pela figura 4.7., observa-se apenas a formação de duas zonas, a do óleo (petróleo) e a aquosa.



Figura 4.7. Imagem do resultado da análise de emulsificação, com apenas duas zonas distintas.

Assim sendo, era de se esperar a formação de uma zona de aspeto turvo entre a parte aquosa e o petróleo, o que evidenciaria a existência de biosurfactantes.

4.2.3 Resultados de tensão superficial

Na figura 4.8. encontram-se representados os valores da tensão superficial das amostras do meio de crescimento VI da cultura de *B. cereus* nos tempos 20, 40 minutos, 1, 2, 24 e 44 horas. Verifica-se um ligeiro decréscimo de 66,8958 mN/m (valor médio) para 65,2024 mN/m. Para a água destilada, foi registada uma tensão superficial média de 65,8070 mN/m, que se encontra representada a tracejado.

A presença de biosurfactantes permite reduzir a tensão superficial do sobrenadante para valores de cerca de 25 nM/m, como é descrito na bibliografia e visível na figura 4.9. que se refere ao estudo da variação da tensão superficial ao longo do crescimento de três espécies bacterianas distintas, provenientes de campos petrolíferos do Irão [6].

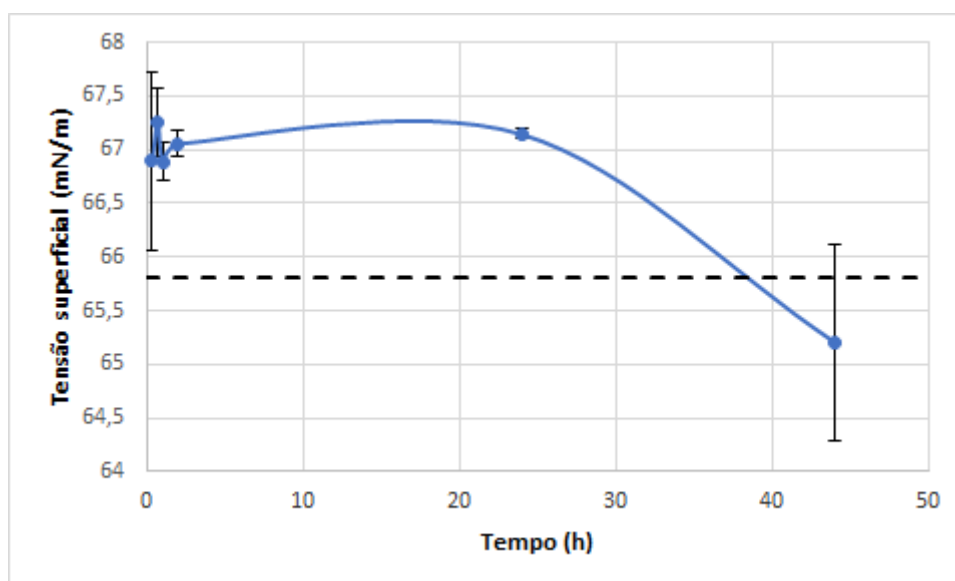


Figura 4.8. Evolução da tensão superficial do sobrenadante durante o crescimento VI de *Bacillus cereus*. A tensão superficial da água está representada a tracejado.

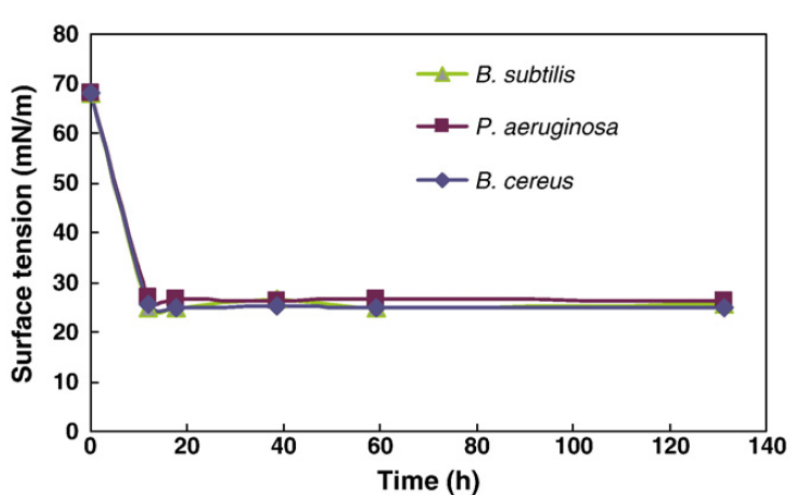


Figura 4.9. Tensão superficial do sobrenadantes em fermentações de *B. cereus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa* [6].

Este resultado também demonstra a reduzida quantidade de biosurfactante produzido pelas bactérias comerciais utilizadas. Estes resultados permitem confirmar que as bactérias sem contacto prévio e duradouro com o petróleo não se encontram adaptadas para a produção do biosurfactantes. Podendo-se concluir que as bactérias possuem elevada capacidade de adaptação e em meios com petróleo produzem biosurfactante, dado que os resultados obtidos com as bactérias das mesmas estirpes, mas de proveniências diferentes dão resultados radicalmente diferentes.

4.3 SIMULAÇÃO DO RESERVATÓRIO

No modelo construído neste trabalho para simulação de um reservatório petrolífero de forma a avaliar a capacidade de recuperação do petróleo da coluna foi primeiramente injetada com solução salina até à sua saturação. De seguida a coluna foi saturada com crude. Num terceiro enchimento, fez-se circular novamente solução salina e foi retirada uma certa quantidade de crude, de modo análogo à recuperação secundária, na qual a adição de um fluido permite extração adicional de crude. Seguiu-se a circulação da solução com biosurfactante através da coluna, mas não foi possível retirar mais petróleo da coluna para além do retirado pela solução anterior, tendo a coluna ficado com o mesmo petróleo retido, como é visível na figura 4.10. Este resultado comprova que a solução com biosurfactante não possibilitou a recuperação terciária, dado que a quantidade de biosurfactante era muito reduzida (como se comprovou pelos resultados anteriores).



Figura 4.10. Coluna com petróleo retido.

Quando o objetivo em laboratório é testar modelos para aplicação em larga escala, muitas experiências são realizadas numa coluna com areia para simular condições em reservatórios petrolíferos. Um exemplo da utilização destes modelos foi realizado com biosurfactante sintetizado pelas estirpes *B. subtilis* PT2 e *P. aeruginosa* SP4, cujo teor de recuperação de petróleo superou mesmo a de surfactantes sintéticos, atingindo 61% para *B. subtilis* e 57% para *P. aeruginosa*. Em outro estudo realizado com *Bacillus licheniformis* K125, o bioemulsificante resultante baixou a tensão superficial para 34 mN/m e teve um teor de recuperação, após extração com água, em 43% [29].

4.4 TESTE DA VELOCIDADE DE CORROSÃO

O teste da velocidade de corrosão, por perda de massa, foi realizado com três soluções distintas: crude, solução salina 10 g/l e a solução de biosurfactante do crescimento V de *B. cereus*. As placas de aço foram pesadas e mergulhadas nas soluções (figura 4.11.). Foram retiradas e pesadas novamente ao fim de 7 e 45 dias (figuras 4.12. e 4.13., respectivamente).

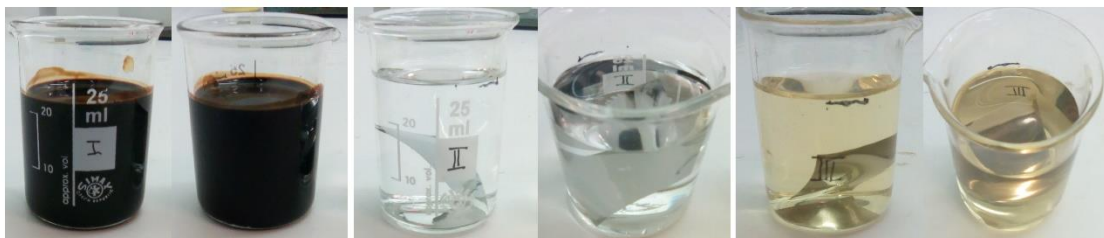


Figura 4.11. Amostras de placas de aço 316 mergulhadas em I) crude, II) Solução salina 10 g/L; III) Solução de biosurfactante numa fase inicial.

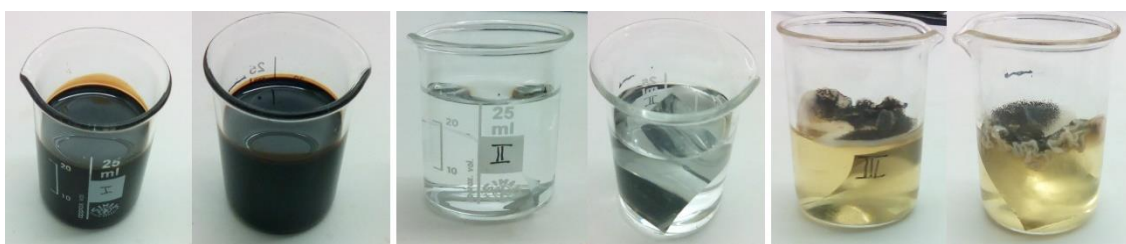


Figura 4.12. Amostras de placas de aço 316 mergulhadas em I) crude, II) Solução salina 10 g/L; III) Sobrenadante da biosurfactante passados 7 dias.

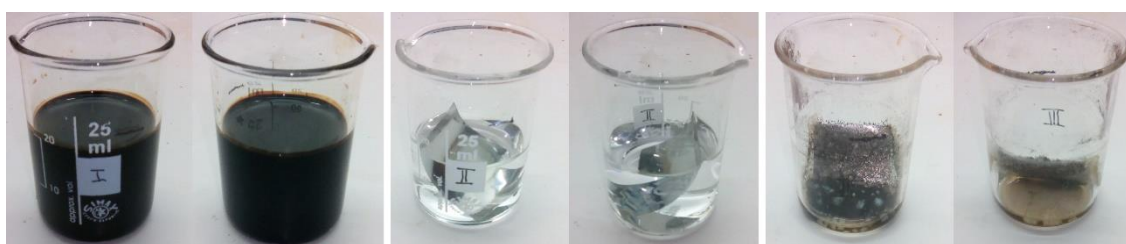


Figura 4.13. Amostras de placas de aço 316 mergulhadas em I) crude, II) Solução salina 10 g/L; III) Solução de biosurfactante passados 45 dias.

A variação da massa das placas de aço foram as seguintes (figura 4.14.):

- A amostra a ser colocada em crude pesa 0,146 g. A massa não sofreu variação desde o início até ao fim deste estudo, consequentemente não se tendo verificado degradação desta amostra;
- A amostra mergulhada em salmoura, pesava 0,146 g. Ao fim de 7 dias pesava 0,145 g e ao fim de 45 dias pesava 0,146 g;

- A amostra inserida na solução de biosurfactante pesava 0,141 g e após 7 dias pesava 0,140 g. Decorridos os 45 dias, com formação de biofilme na sua superfície, não se tendo realizado a sua pesagem.

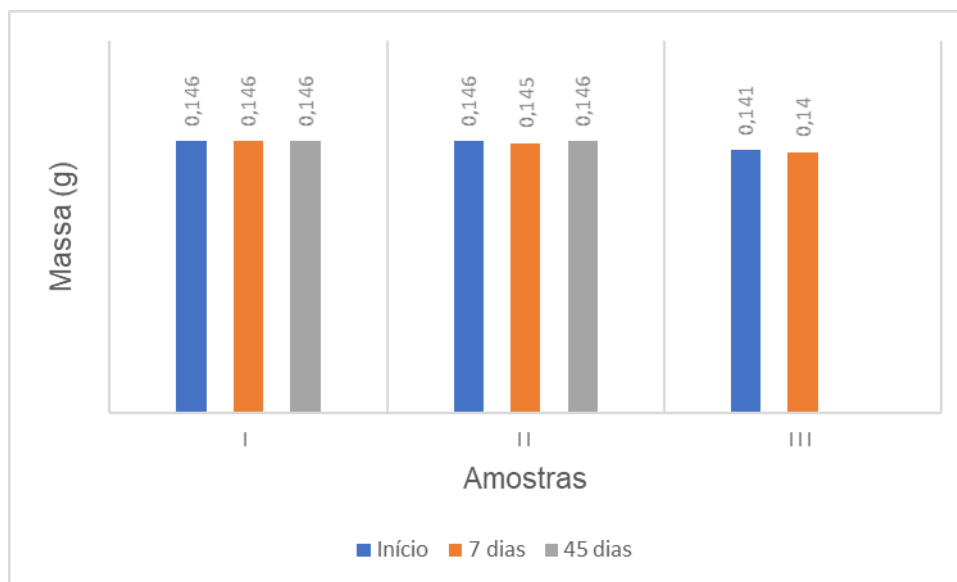


Figura 4.14. Variação da massa das placas de aço 316 mergulhadas em I) crude, II) Solução salina 10 g/L; III) Solução de biosurfactante, no início ao fim de 7 e 45 dias.

Teoricamente, era de se esperar um ataque na amostra mergulhada em petróleo, devido à presença da SRB. Contrariamente, na solução de biosurfactante, o ideal seria uma taxa de corrosão mínima. Apesar de não ter sido registado uma descida, não significa necessariamente a inexistência de corrosão, por não haver reduções da massa da amostra em petróleo.

4.5 CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS A PARTIR DE AREIA CONTAMINADA

Como se comprovou que as quantidades de biosurfactantes produzidas pelas estipes bacterianas comerciais eram muito baixas desenvolveu-se um método que permitisse o crescimento de microrganismos que eventualmente se encontrassem em areias contaminadas com crude a fim de selecionar algumas colónias de bactérias existentes nesse ambiente.

Foram isoladas quatro colónias de bactérias que posteriormente foram inoculadas, da mesma forma que a *B. cereus* e *P. aeruginosa* comerciais utilizadas ao longo do trabalho. Foi efetuada a leitura da densidade ótica, para confirmar o seu crescimento. A colónia 1 cresceu pouco possivelmente porque os meios utilizados não eram adequados para o seu crescimento, enquanto que a colónia 2 foi a que mais se replicou (figura 4.15).

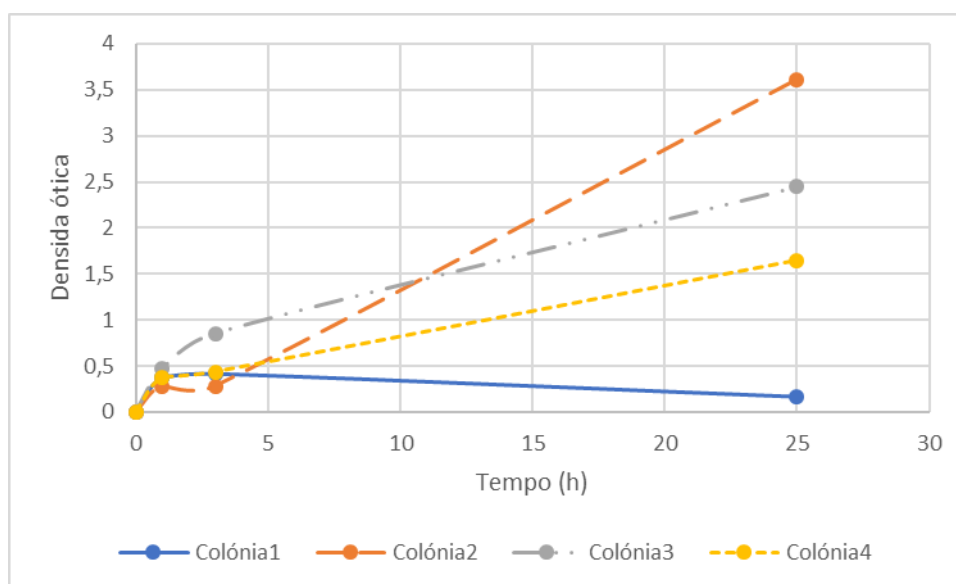


Figura 4.15. Leitura da densidade ótica durante dos crescimentos das colônias isoladas.

Para detetar a possível existência de biosurfactante através das análises qualitativas foram realizados os testes do ensaio de propagação do petróleo e análise de emulsificação, que deram igualmente negativos, possivelmente porque não foram identificadas as colônias isoladas, pelo que não se sabe se serão das que têm capacidade de produzir biosurfactante e caso sejam o tempo de contacto da areia com o petróleo foi muito reduzido, tendo sido apenas de 2 meses.

5. CONCLUSÕES

Os testes de caracterização de biosurfactante foram todos classificados como negativos: não se verificou propagação do petróleo, não se observou uma zona de emulsão nem a tensão superficial do sobrenadante sofreu redução significativa ao longo do crescimento, o que indica que estas bactérias, nas presentes condições, foram incapazes de produzir, ou produzidas em concentrações mínimas, biosurfactantes. Adicionalmente, na operação da coluna com a areia, não houve qualquer extração do petróleo após se injetar a solução com biosurfactantes.

Quanto ao teste da taxa de corrosão, os resultados obtidos não permitem tirar conclusões quanto à oxidação sofrida do aço 316 exposto às três soluções. Apesar de se registar uma diminuição de 0,146 g para 0,145 g ao sétimo dia, após se voltar a se registar no dia 45, a massa voltou para 0,146 g, possivelmente pela sensibilidade da balança digital.

Dada a incapacidade das bactérias comerciais em produzir biosurfactantes, culturas bacterianas foram isoladas de uma comunidade existente em areias contaminadas por petróleo, na tentativa de encontrar possíveis candidatos para a síntese de biosurfactantes. No entanto, nenhuma cultura apresentou tal característica.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem deduzir que as bactérias deverão ter elevada capacidade de se adaptar ao meio em que se encontram, porque as mesmas estirpes sem estarem em meios com petróleo não produzem biosurfactantes, ao invés das que foram isoladas em campos petrolíferos como descrito pela bibliografia. Através desses estudos pode-se afirmar que a existência de biosurfactantes, fomenta a recuperação terciária de petróleo. Pelo que com uma estratégia adequada a utilizar nos campos petrolíferos seria fomentar o crescimento bacteriano e simultaneamente produção de biosurfactantes, de forma a ter níveis de recuperação de petróleo pretendidas.

No entanto, esta Dissertação de Mestrado possibilitou a implementação destes métodos na Escola a utilizar em trabalhos futuros. Apresentando-se algumas sugestões de trabalhos a desenvolver:

- Isolamento de um grande número de culturas de origem de campos petrolíferos e realização inicial dos métodos mais simples para identificar mais rapidamente possíveis candidatos, bem como seleção cuidada da fonte de carbono;
- Na coluna de areia sintetizar biosurfactantes *in situ*, ou seja, o produto é obtido a partir das bactérias existentes na areia dentro da coluna, por adição de nutrientes;
- No teste da corrosão efetuar a medição de amostras metálicas de maior dimensão/massa. Adicionalmente, essas amostras podem estar sujeitas a fluidos em movimento, com mudanças de trajetória bruscas e/ou turbulências.
- Implementar método de quantificação de biosurfactantes.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Stedile, T., Beims, R. F., Ender, L., Scharf, D. R., Simionatto, E. L., Meier, H. F., & Wiggers, V. R. (2019). *EVALUATION OF DISTILLATION CURVES FOR BIO-OIL OBTAINED FROM THERMAL CRACKING OF WASTE COOKING OIL*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 36(1), 573–585.
- [2] Patel, J., Borgohain, S., Kumar, M., Rangarajan, V., Somasundaran, P., & Sen, R. (2015). *Recent developments in microbial enhanced oil recovery*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 52, 1539–1558.
- [3] Kryachko, Y. (2018). *Novel approaches to microbial enhancement of oil recovery*. Journal of Biotechnology, 266, 118–123.
- [4] Gudiña, E. J., Pereira, J. F. B., Rodrigues, L. R., Coutinho, J. A. P., & Teixeira, J. A. (2012). *Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery*. International Biodeterioration & Biodegradation, 68, 56–64.
- [5] Behlülçil, K., & Mehmetoğlu, M. T. (2002). *Bacteria for Improvement of Oil Recovery: A Laboratory Study*. Energy Sources, 24(5), 413–421.
- [6] Amani, H., Sarrafzadeh, M. H., Haghighi, M., & Mehrnia, M. R. (2010). *Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 75(1-2), 209–214.
- [7] Karimi, M., Mahmoodi, M., Niazi, A., Al-Wahaibi, Y., & Ayatollahi, S. (2012). *Investigating wettability alteration during MEOR process, a micro/macro scale analysis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 95, 129–136.
- [8] Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., & Desai, A. J. (2008). *Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions*. Bioresource Technology, 99(1), 195–199.
- [9] Pruthi, V., & Cameotra, S. S. (1997). *Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by Serratia marcescens*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 13(1), 133–135.
- [10] Cooper, D. G., S. N. Liss, R. Longay, and J. E. Zajic. 1989. *Surface activities of Mycobacterium and Pseudomonas*. J. Ferment. Technol. 59:97–101.
- [11] Cooper, D. G., and D. A. Paddock. 1983. *Torulopsis petrophilum and surface activity*. Appl. Environ. Microbiol. 46:1426–1429.

- [12] Hommel, R. K., O. Stuver, W. Stuber, D. Haferburg, and H. P. Kleber. 1987. *Production of water-soluble surface-active exolipids by Torulopsis apicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:199–205.
- [13] Kitamoto, D., Yanagishita, H., Shinbo, T., Nakane, T., Kamisawa, C., & Nakahara, T. (1993). *Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by Candida antarctica*. *Journal of Biotechnology*, 29(1-2), 91–96.
- [14] Kim, H.-S., Yoon, B.-D., Choung, D.-H., Oh, H.-M., Katsuragi, T., & Tani, Y. (1999). *Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from Candida sp. SY16*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5), 713–721.
- [15] Asperger O., Kleber HP., K.J., Bergogne-Bérézin E., Fewson C.A. (1991). *Metabolism of Alkanes by Acinetobacter*. Federation of European Microbiological Societies Symposium Series, vol 57. Springer, Boston, MA.
- [16] Stewart, T. L., & Fogler, H. S. (2000). *Biomass plug development and propagation in porous media*. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(3), 353–363.
- [17] J. Akit Ramsay , D.G. Cooper & R. J. Neufeld (1989) *Effects of oil reservoir conditions on the production of water-insoluble Levan by Bacillus licheniformis* *Geomicrobiology Journal*, 7:3, 155-165.
- [18] Cabalar, A. F., Wiszniewski, M., & Skutnik, Z. (2017). *Effects of Xanthan Gum Biopolymer on the Permeability*, Odometer, Unconfined Compressive and Triaxial Shear Behavior of a Sand. *Soil Mechanics and Foundation Engineering*, 54(5), 356–361.
- [19] Nazina T, et al. *Microbiological investigations of high-temperature horizons of the Kongdian petroleum reservoir in connection with field trial of a biotechnology for enhancement of oil recovery*. *Microbiology* 2007;76 (3):287–96.
- [20] Kalish P.J., Stewart, J.A., Rogers, W.F., and Bennett, E.O., 1964: *The effects of bacteria on sandstone permeability*. *J. Petroleum Technology* 16:805-814.
- [21] ZoBell CE (1947) *Bacteria Release of Oil from Oil Bearing Materials*, Part I and II. *World Oil* 126, 13: 36-47 (I), 35-41 (II).
- [22] Khire JM, Khan MI, (1994) *Microbially Enhanced Oil Recovery (MEOR), Part I, Importance and Mechanism of MEOR*. *Enzyme Microbiol. Tech*, 16: 170-2.
- [23] Bryant RS. *Potential uses of microorganisms in petroleum recovery technology*. In: *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*; 1987.
- [24] Soares da Silva, R. de C. F., Almeida, D. G., Meira, H. M., Silva, E. J., Farias, C. B. B., Rufino, R. D., ... Sarubbo, L. A. (2017). *Production and characterization of a new biosurfactant from Pseudomonas cepacia grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 206–215.

- [25] https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/16583/16583_3.PDF. Data de acesso: 28 de novembro de 2019.
- [26] Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). *Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review*. Critical Reviews in Biotechnology, 30(2), 127–144.
- [27] Mukherjee, A. K., & Das, K. (2010). *Microbial Surfactants and Their Potential Applications: An Overview*. Biosurfactants, 54–64.
- [28] Edward JR, Hayashi JA. *Structure of a rhamnolipid from pseudomonas aeruginosa*. Arch Biochem Biophys 1965; 111:415-421.
- [29] Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., ... Marchant, R. (2010). *Microbial biosurfactants production, applications and future potential*. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(2), 427–444.
- [30] Rapp P, Bock H, Wray V, Wagner F (1979) *Formation, isolation and characterisation of trehalose dimycolates from Rhodococcus erythropolis grown on n-alkanes*. J Gen Microbiol 115:491–503.
- [31] Chen J, Song X, Zhang H et al. *Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from wickerhamiella domercqiae*. Enzyme Microb Technol 2006; 39:501-506.
- [32] Rau U, Hammen S, Heckmann R et al. *Sophorolipids: a source for novel compounds*. Ind Crops Prod 2001; 13:85-92.
- [33] Konishi M, Morita T, Fukuoha T, Imura T, Kakugawa K, Kitamoto D (2007b) *Production of different types of mannosylerythritol lipids as biosurfactant by the newly isolated yeast strains belonging to the genus Pseudozyma*. Appl Microbiol Biotechnol 75:521–531.
- [34] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. *Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by bacillus subtilis: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation*. Biochem Biophys Res Commun 1968; 31:488-494.
- [35] Peypoux F, Besson F, Michel G et al. *Structure de l'iturine C de bacillus subtilis*. Tetrahedron 1978; 38:1147-1152.
- [36] Wang J, Liu J, Wang X et al. *Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by bacillus subtilis*. Lett Appl Microbiol 2004; 39:98-102.
- [37] McInerney MJ, Javaheri M, Nagle DP. *Properties of the biosurfactant produced by bacillus licheniformis strain JF-2*. J Ind Microbiol 1990; 5:95-102.
- [38] Wayman M, Jenkins AD, Kormady AG. *Biotechnology for oil and fat industry*. J Am Oil Chem Soc 1984; 61:129-131.

- [39] Robert M, Mercade ME, Bosch MP et al. *Effect of the carbon source on biosurfactant production by pseudomonas aeruginosa 44T*. Biotechnol Lett 1989; 11:871-874.
- [40] Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C et al. *Emulsifier arthrobacter RAG-1: isolation and emulsifying properties*. Appl Environ Microbiol 1979; 37:402-408.
- [41] Rosenberg E, Rubinovitz C, Legmann R et al. *Purification and chemical properties of acinetobacter calcoaceticus A2 biodispersan*. Appl Environ Microbiol 1988; 54:323-326.
- [42] Navonvenezia S, Zosim Z, Gottlieb A et al. *Alasan, a new bioemulsifier from acinetobacter radioresistens*. Appl Environ Microbiol 1995; 61:3240-3244.
- [43] Cirigliano MC, Carman GM. *Isolation of a bioemulsifier from candida lipolytica*. Appl Environ Microbiol 1984; 48:747-750.
- [44] Kappeli O, Finnerty WR. *Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane- grown acinetobacter*. J Bacteriol 1979; 140:707-712.
- [45] Faria, A. *Produção, purificação e caracterização química de biosurfactantes produzidos por bacillus subtilis em glicerina residual*. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2010.
- [46] Haddadin MSY, Abou Arqoub AA, Abu Reesh I, Haddadin J (2009) *Kinetics of hydrocarbon extraction from oil shale using biosurfactant producing bacteria*. Energy Convers Manag 50:983–990.
- [47] Makhlof, A. S. H., Herrera, V., & Muñoz, E. (2018). *Corrosion and protection of the metallic structures in the petroleum industry due to corrosion and the techniques for protection*. Handbook of Materials Failure Analysis, 107–122.
- [48] F. Ma, *Corrosive effects of chlorides on metals, Pitting Corrosion*, InTech, Rijeka, Croatia, (2012) pp. 142-143.
- [49] Bhandari, J., Khan, F., Abbassi, R., Garaniya, V., & Ojeda, R. (2015). *Modelling of pitting corrosion in marine and offshore steel structures – A technical review*. Journal of Loss Prevention in the Process Industries, 37, 39–62.
- [50] M. Mandel, L. Krüger, *Determination of pitting sensitivity of the aluminium alloy EN AW-6060-T6 in a carbon-fibre reinforced plastic/aluminium rivet joint by finite element simulation of the galvanic corrosion process*, Corros. Sci. 73 (2013) 172–180.
- [51] Su, H., Tang, R., Peng, X., Gao, A., & Han, Y. (2019). *Corrosion behavior and mechanism of carbon steel influenced by interior deposit microflora of an in-service pipeline*. Bioelectrochemistry, 107406.
- [52] S.S. Al-Jaroudi, A. Ul-Hamid, M.M. Al-Gahtani, *Failure of crude oil pipeline due to microbiologically induced corrosion*, Corros. Eng. Sci. Technol. 46 (4) (2011) 568–579.

- [53] Chen, C.Y., Baker, S.C., Darton, R.C., (2006). *Batch production of biosurfactant with foam fractionation*. Chem. Technol. Biotechnol. 81, 1923–1931.
- [54] Kanchan, R. (2017). *Novel Applications of Crude Bacterial BioSurfactant*. International Journal of Life Sciences and Technology (2017), Volume 10, Issue 4, Page(s):38-44.
- [55] Pacwa-Płociniczak, M., Płociniczak, T., Iwan, J., Żarska, M., Chorążewski, M., Dzida, M., & Piotrowska-Seget, Z. (2016). *Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits*. Journal of Environmental Management, 168, 175–184.
- [56] Alenezi, F. N., Rekik, I., Chenari Bouket, A., Luptakova, L., Weitz, H. J., Rateb, M. E., ... Belbahri, L. (2017). *Increased Biological Activity of Aneurinibacillus migulanus Strains Correlates with the Production of New Gramicidin Secondary Metabolites*. Frontiers in Microbiology, 8.
- [57] Galante, R. *Esterilização de hidrogéis para aplicações biomédicas*. Dissertação de Doutoramento, Universidade de Lisboa Instituto Superior Técnico, 2017.